

Über die Beeinflussung der durch Thyroxin
beschleunigten Kaulquappenmetamorphose
durch die Tetracycline, Penicillin
und andere wachstumsfördernde Verbindungen

Carl Maria Hieber

Aus dem Institut für Physiologie und Ernährung der Tiere
der Universität München
Vorstand: Professor Dr. Dr. Johannes B r ü g g e m a n n

Über die Beeinflussung der durch Thyroxin beschleunigten
Kaulquappenmetamorphose durch die Tetracykline, Penicillin
und andere wachstumsfördernde Verbindungen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der veterinärmedizinischen Doktorwürde der
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Carl Maria Hieber
Veterinärpraktikant
aus
München

München 1958



Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Professor Dr. K. Z i p f

Referent: Professor Dr. Dr. Johs. B r ü g g e m a n n n

Tag der Promotion: 26. Februar 1958

U N I - Druck, München 13, Amalienstraße 85

In den letzten Jahren wurde in zahlreichen Versuchen nachgewiesen, daß mehrere Verbindungen unterschiedlicher chemischer Natur die Gewichtszunahme landwirtschaftlicher Nutztiere beschleunigen. Auch beim Menschen, in Gewebekulturen oder bei Laboratoriumstieren konnte eine synthesefördernde Wirkung für diese Substanzen nachgewiesen werden. Es handelt sich insbesondere um einige Antibiotika (1), anabol wirkende Sexualhormone (2; 3), die Vitamine A, E und D (4 - 10), das T-Vitamin (Götsch) (11 - 13), einige oberflächenaktive Substanzen (Alkyl-Arylsulfonate (14); Äthylenoxyd-Fettsäureverbindungen (15) und um einige Schwermetallverbindungen (16 - 21).

Zur Erklärung der Wirkungsweise wurden primär die naheliegendsten Möglichkeiten in Betracht gezogen. Der Angriffspunkt der Antibiotika wurde dort gesucht, wo Mikroorganismen beim Vielzeller biologische Funktionen zu erfüllen haben, nämlich in der Darmflora. Der Effekt der fettlöslichen Vitamine wurde als spezifischer Vitamineffekt gedeutet. Bei der Anwendung oberflächenaktiver Substanzen wurde eine Verbesserung der Resorption von Fetten, Lipoiden und fettlöslichen Vitaminen vermutet, die sekundär zu einer Beschleunigung der Gewichtszunahme führen sollte. Die Wirkung der Schwermetallverbindungen schließlich wurde teilweise durch eine Spurenelementwirkung, teilweise durch die antibakterielle Aktivität dieser Substanzen erklärt.

Die Annahme, daß zwischen der Beeinflussung von Darmbakterien durch mikrobielle Hemmstoffe und der beobachteten Mehrzunahme ein Zusammenhang besteht, wurde erstmals durch Versuche von Luckey u. M. erschüttert, in denen auch bei keimfrei aufgezogenen Tieren durch Antibiotikazufütterung Wachstumsbeschleunigungen erzielt wurden (22). Etwa gleichzeitig wurde von anderer Seite mitgeteilt, daß inaktiviertes, also antibakteriell unwirksames Penicillin schnellere Gewichtszunahme bewirken kann (23 - 27). Dieser Befund konnte kürzlich auch auf die Antibiotika der Tetracyclinreihe ausgedehnt werden (28).

Bei näherer Betrachtung der mit fettlöslichen Vitaminen durchgeführten Versuche ist zu bemerken, daß zur Erzielung eindeutiger Mehrzunahmen wesentlich höhere Vitaminkonzentrationen angewendet werden mußten, als zur Verhütung von Vitaminmangelerscheinungen erforderlich sind. Außerdem wurde gefunden, daß sich die bei wachsenden Tieren durch E-Mangelfütterung (ohne akute Mangelsymptome) hervorgerufene Verminderung der Gewichtszunahme sowohl durch Vitamin E als auch durch Aureomycin normalisieren läßt. Der Vitamin E-Anteil, der über den zur Verhütung spezifischer Mangelsymptome not-

wendigen Betrag hinaus zugeführt wird und zu einer Beschleunigung der Gewichtszunahme Anlaß gibt, scheint demnach durch unspezifische Faktoren (z.B. Aureomycin) ersetzt werden zu können (5). Auch die Konzentration an Sexualhormonen muß ähnlich hoch eingesetzt werden, wenn eine deutliche Wirkung auf das Wachstum des Gesamtorganismus erzielt werden soll. Die gewebs- bzw. organspezifische anabole Wirkung dieser Verbindungen (etwa die Wirkung des E-Vitamins auf die Skelettmuskulatur oder die Östrogenwirkung auf den Uterus) scheint daher bei hohen Konzentrationen (ca. 100-fach über dem biologischen Bedarf) in unspezifischer Weise den Gesamtorganismus erfassen zu können.

Ähnliche Verhältnisse lassen sich bei eingehendem Studium der beschriebenen Schwermetalleffekte aufdecken. Die für die Diskussion einer spezifischen Spurenelementwirkung vertretbaren Konzentrationen müssen um etwa zwei Zehnerpotenzen überschritten werden, um eine gesicherte Wirkung zu erzielen. Es wird dabei, z.B. nach der Verabreichung von Kupfersulfat an Mastschweine, der Kupfergehalt der Lebern auf das achtfache der Kontrollwerte gesteigert (18). In diesem Falle kann von einer "Spurenelementwirkung" mit Sicherheit keine Rede mehr sein. Vielmehr scheinen alle diese Erfahrungen darauf hinzuweisen, daß durch eine unspezifische Reaktion im intermediären Stoffwechsel, zu der chemisch völlig verschiedene Verbindungen befähigt sind, eine Beschleunigung der Gewichtszunahme um etwa denselben Betrag (10 - 20 %) erhalten werden kann.

Es sind aber noch andere Verbindungen bekannt geworden, mit deren Hilfe eine schnellere Gewichtszunahme erzielt werden kann, z.B. die Thyreostatika (29; 30). In diesem Falle dürfte die Wirkungsweise sogar feststehen. Da das Thyroxin die Substratdissimilation und damit den Abbau von Eiweiß- und Fettsubstanzen fördert, läuft eine Verminderung der Thyroxinproduktion durch Thyreostatika mit einer Herabsetzung dissimilatorischer Stoffwechselprozesse parallel. Gleichzeitig nimmt die N-Ausscheidung ab. Es hat den Anschein, als sei im intermediären Stoffwechsel durch hormonale Regulatoren eine Resultante zwischen dem Abbau und dem Aufbau von Zellsubstanz eingestellt, derart, daß durch oxydative Prozesse gerade die zur Synthese bzw. zur Zellteilung erforderliche Energie bereitgestellt wird (Optimalzustand) (31). Natürlicherweise wird die Einstellung der Resultante bei den wenigsten Tieren optimal sein, sondern dürfte durch äußere Einflüsse (Haltung, Fütterung, Infektion) mehr oder weniger stark eine Verschiebung zu Gunsten dissimilatorischer Prozesse erfahren (Stimulierung von Nebenniere und Schilddrüse, subklinische "Stress"-Situation). Durch Anwendung antithyreoidaler Wirkstoffe müßte dem-

nach eine Verschiebung der Resultante zu Gunsten der Synthese von Zellsubstanz möglich sein. Zu bedenken ist natürlich, daß eine derartige "Verschiebung" nur so weit erfolgen darf, als die Produktion der erforderlichen Energie gesichert ist. Andernfalls treten Entwicklungsstörungen auf, die nach langdauernder Verabreichung hoher Thiouracildosen bei wachsenden Tieren auch beobachtet wurden.

Da nun die eingangs erwähnten Verbindungen ebenfalls durch eine anscheinend unspezifische Reaktion die Resultante ähnlich verschieben wie die Thyreostatika (gemessen an der Beschleunigung der Gewichtszunahme), scheint die Frage gerechtfertigt zu sein, ob hinsichtlich der Wirkungsweise aller Verbindungen ein grundsätzlicher Zusammenhang besteht. Diese Frage ist besonders interessant, weil für das Vitamin A schon vor langer Zeit die antithyreoidale Wirksamkeit unter Beweis gestellt werden konnte. In der vorliegenden Arbeit soll daher untersucht werden, ob weitere, die Gewichtszunahme beschleunigende Substanzen ähnlich antithyreoidal wirksam sind.

S c h r i f t t u m

Die antagonistischen Beziehungen einer Substanz zur Thyroxinwirkung können an verschiedenen Kriterien erkannt werden: Verminderung der Kreatinurie, der Grundumsatzsteigerung oder der Wachstumsdepression nach Thyroxinzuführung. Außerdem erlauben die Schilddrüsengewichte Aussagen über antithyreoidale Effekte, da die periphere Abnahme der Thyroxinwirksamkeit mit einer gegenregulatorischen Vergrößerung der Schilddrüse beantwortet wird (verstärkte Bereitstellung von thyreotropem Hormon).

Die Hemmung der Gewichtszunahme von Ratten, die durch langfristige Verabreichung von jodiertem Casein hervorgerufen wird, läßt sich z.B. bei normalem Vitamin B₁₂-Gehalt des Futters durch Penicillin ebenso wie durch Aureomycin vollkommen normalisieren (32). Von anderen Autoren konnte nachgewiesen werden, daß sich das Leben thyroxinvergifteter Ratten durch Zufütterung von Penicillin- oder Aureomycinrückständen um 100 % verlängern läßt (33). Menge und Conner versuchten die antithyreoidale Wirksamkeit des Aureomycins an Hand der Schilddrüsengewichte zu ermitteln (34). Bei einer Aureomycinkonzentration von 50 mg/kg Futter fanden sie eine beginnende, bei 100 mg/kg Futter eine signifikante Vergrößerung des Schilddrüsengewichtes.

Eine antithyreoidale Wirksamkeit der Östrogene ist auch von verschiedenen Seiten beobachtet worden. Bodansky u. M. berichteten, daß trächtige Rattenweibchen eine auffällige Resistenz gegen Thyroxin besitzen (35). In den letzten Tagen der Trächtigkeit nahmen die Tiere selbst unter großen Thyroxindosen noch an Gewicht zu, während entsprechende Kontrolltiere mit starkem Substanzverlust reagierten. Andere Autoren berichten über Erhöhungen des Schilddrüsengewichtes nach Gaben von Östradiolbenzoat (36).

Die antagonistischen Beziehungen des Vitamins A sind, wie schon erwähnt wurde, seit langer Zeit bekannt (37). Braunsteiner u. M. fanden, daß 7 mg Vitamin E / 100 g Ratte den Effekt von 2 mg d, 1-Thyroxin / 100 g Tier auf die Kreatinausscheidung neutralisieren können. Der O₂-Verbrauch der Muskulatur war unter den gleichen Bedingungen nur erhöht, und zwar um 20 %, wenn Thyroxin allein gegeben wurde, nicht dagegen bei gleichzeitiger Zuführung von Vitamin E (38).

Hesse, Jakobi und Bregulla (39) konnten Hunde, die mit Thyroxin vergiftet waren, durch kleine Kupfermengen (0,4 mg Cu⁺⁺ / kg Hund) am Leben erhalten

und trotz der Thyreotoxikose eine erhebliche Gewichtszunahme erzielen. Anderen Autoren gelang es, eine entsprechende Thyroxinvergiftung durch Verabreichung von Eisen- und Arsenverbindungen zu neutralisieren, gemessen an Hand der Einschmelzung von Fettdepots, Gewichtsabnahme und dem Glykogenschwund in der Leber (40).

Ein besonders empfindlicher und seit langer Zeit gebräuchlicher Test zur Bestimmung sehr geringer Thyroxinaktivitäten beruht auf der Beeinflussung des Wachstums und der Differenzierung von Froschlarven (Romeis (41)). Schon eine Wirkstoffverdünnung von 1:3⁸ ist ausreichend, um einen charakteristischen Thyroxineffekt an der Kaulquappe hervorzurufen. Mustakallio und Telkkä (42) vertreten die Ansicht, daß die Kaulquappen zum Studium der Beziehungen zwischen exogenen Wachstumsfaktoren und endogenen Wachstumsregulatoren besonders geeignet sind. Müller und Mislin (43) bezeichnen sie direkt als "Ernährungsmodell".

Von Mustakallio u.M. wurde die Wirkung des Aureomycins auf die Kaulquappenmetamorphose untersucht (44). Die Autoren verfütterten getrocknete Leber und gaben das Thyroxin am 1., 5. und 10. Versuchstag ins Wasser (5 bzw. 15 ~~µl~~ ml Wasser). Das Wachstum wurde bei dieser Versuchsanstellung stark stimuliert und die Metamorphose geringgradig verzögert. Goetsch konnte mit mikrobiologisch aktivem und inaktivem Penicillin Wachstumsbeschleunigungen bei Kaulquappen erzielen, allerdings ohne meßbare Änderung der Metamorphose (23).

Gessner fand mit Vitamin D, das in Form von Vigantol in einer Verdünnung von 1:30 000 als unentmischbare Emulsion ins Wasser gegeben wurde, bei *Bufo vulgaris*-Larven einen Wachstumszuwachs und eine Beschleunigung der Metamorphose (45). Der Verfasser kommt zu dem Schluß, daß das D-Vitamin keine unmittelbare, d.h. keine schilddrüsenartige Wirkung besitzt, sondern daß durch die Beschleunigung des Wachstums die Metamorphoseschwelle eher erreicht wird (scheinbare Metamorphosebeschleunigung). Nach Wurbach wirkt Vitamin D im Sinne eines Wachstumsfaktors (46). Wurbach fand Wachstumsbeschleunigungen bei Froschlarven nach Zufütterung der Vitamine A bzw. D und beobachtete weiterhin, daß die Schädigungen, die durch die thyroxinbedingte Stoffwechselsteigerung hervorgerufen wurden, durch Zulage eines dieser Vitamine normalisiert werden konnten.

Von demselben Verfasser werden außerdem folgende Substanzen herausgestellt, die bei Kaulquappen wachstumsfördernd wirken sollen (47):

Diäthylstilböstrol

Antibiotika und Vitamin B₁₂

Methylthiouracil

β -Indolylessigsäure

die Vitamine A und E

Kupfer- und Arsenverbindungen.

Der Effekt des Vitamins E wurde von Wurbach (48) eingehend untersucht. Vitamin E beschleunigte das Wachstum der Larven um 270 % (500 mg Endgewicht gegenüber 136 mg bei der Kontrolle). Durch Verfütterung des Vitamins an Kaulquappen, die in thyroxinhaltigem Wasser gehalten wurden, konnte der antithyreoidale Effekt dieses Vitamins nachgewiesen werden. In der Diskussion der Ergebnisse versucht der Verfasser zum Ausdruck zu bringen, daß der Vitamin-E-Effekt nicht mit der Thiouracilwirkung (direkte Wirkung auf die Schilddrüse) zu vergleichen ist, sondern vermutlich durch Beeinflussung der Nebennierenrinden-(NNR)-funktion zustande kommt (Stimulierung der NNR-Funktion).

Eufinger u. Gottlieb berichteten über eine sehr starke antithyreoidale Wirkung des Vitamins A, gemessen ebenfalls im Kaulquappentest. Nach diesen Versuchen sind 200 E Vitamin A in der Lage, die Wirkung von 3 μ g Thyroxin in 400 ml Wasser aufzuheben (49).

Müller und Mislin (43) gaben Larven von *Rana radibunda* als Vitamin E enthaltende Substanz Ephynal, und zwar zu 50 mg reinem Caseinfutter 7 mg Ephynal. Sie erhielten eine Wachstumsbeschleunigung von 60 % gegenüber Casein-Sesamöl-Kontrollen (Vitamin E-Tiere 222 mg, Kontrollen 152 mg). Martella (50) bekam mit Vitamin E bei *Bufo vulgaris*-Larven einen geringen, aber eindeutigen Wachstumseffekt. Die Versuche wurden mit sehr großen und schon weit entwickelten Larven durchgeführt. Fischer fand nach Verfütterung von α -Tokopherol eine Verstärkung des Längenwachstums und eine starke Hemmung der durch Thyroxin beschleunigten Kaulquappenmetamorphose (51).

Auch das T-Vitamin fördert nach Untersuchungen von Goetsch (52; 53) Wachstum und Entwicklung der Kaulquappen. Gleichzeitig wird die Futterausnutzung um etwa 15 - 20 % verbessert.

Für die eigenen Versuche wurde ebenfalls der Kaulquappentest herangezogen, und zwar wurde absichtlich eine verhältnismäßig große Thyroxinmenge angeboten (0,02 μ g, 1-Thyroxin/ml), um die Metamorphose bei ausschließlicher Thyroxinangebot innerhalb von 10 Tagen zum Abschluß zu bringen. Die Tiere wurden also bei allen Versuchen in thyroxinhaltigem Wasser gehalten. Wurde jetzt eine antithyreoidal wirkende Substanz gleichzeitig verabreicht, so war zu erwarten, daß die Metamorphose später eintrat und die Abnahme des Körpergewichtes entsprechend der Wirkungsintensität der betreffenden Substanz geringere Ausmaße erreichte.

Da durch das Thyroxinangebot ein physiologischer Prozeß, der normalerweise in mehreren Monaten abläuft, auf wenige Tage zusammengedrängt wird, kann man die Ansicht vertreten, daß der Test unter unphysiologischen Bedingungen erfolgt und daher keine absolute Beweiskraft besitzt. Jedenfalls scheint ein entsprechender Ansatz erforderlich zu sein, in dem den Kaulquappen dieselben Substanzen unter normalen Bedingungen angeboten werden.

Ein orientierender Versuch in dieser Art ist mit Aureomycin angesetzt worden. Als Ergebnis konnte eine Beschleunigung der Gewichtszunahme registriert werden, ohne charakteristische Verzögerung der Metamorphose, was auch von Telkkä u. M. (44) beobachtet wurde. Wie aus der Literaturübersicht zu entnehmen ist, bewirkten auch alle anderen Substanzen, die in dieser Art geprüft wurden, nur Mehrwachstum, bei geringgradig beschleunigter oder schwach gehemmter Metamorphose. Nach diesen Ergebnissen kann die antithyreoidale Wirksamkeit einer Verbindung bei einer derartigen Versuchsanstellung nicht eindeutig ermittelt werden.

Durch eingehende Überlegung wird diese Tatsache auch verständlich. Führt man einem normalen Organismus eine antithyreoidale Substanz zu, so muß man als Reaktion eine Steigerung der Thyreotropin- und damit Thyroxinproduktion* erwarten, was entsprechend gefunden worden ist (34). Auch bei steigender Dosierung dürfte die Wirkung der Substanz immer in etwa gleichem Umfang kompensiert werden, so daß ein antithyreoidaler Effekt unter diesen Bedingungen nicht an Hand der Metamorphose, wohl dagegen unter Auswertung des Schilddrüsengewichtes nachgewiesen werden kann. Wird dagegen das Thyroxin in einer für alle Versuche konstanten Konzentration angeboten, so kann die Schilddrüsenreaktion in der Kaulquappe unberücksichtigt bleiben und die Wirksamkeit verschiedener antithyreoidaler Verbindungen durch Messung der Metamorphosegeschwindigkeit, der Körperlänge und des Trockengewichtes direkt verglichen werden.

Mit der hier gewählten Versuchsanstellung ließ sich außerdem ermitteln, ob die zu prüfende antithyreoidale Verbindung die Schilddrüse an sich beeinflusst (Verminderung der Thyroxinproduktion), oder ob ein Antagonismus zwischen Thyroxin und synthesesfördernder Substanz im intermediären Stoffwechsel vorliegt. Die in der Larvenschilddrüse produzierte Thyroxinmenge kann nämlich gegenüber dem großen Außenangebot vernachlässigt werden. Weiterhin konnte mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit angenommen werden,

* Abgesehen von den Thiouracilen, welche die Thyroxinsynthese hemmen

daß ein evtl. positiver Effekt der Antibiotika nicht indirekt über eine Beeinflussung der Darmflora, sondern durch direkte Wirkungsentfaltung im intermediären Stoffwechsel zu deuten ist. Eine so große Menge "antithyreoidaler Verbindungen" dürfte durch Stimulierung von Kaulquappendarmbakterien wohl kaum bereitgestellt werden können, daß dieser sehr starke Thyroxineffekt antagonisiert werden kann.

Experimenteller Teil

Die Versuche wurden nach der Anordnung durchgeführt, die Romeis in Abderhaldens "Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden" (41) beschrieben hat. Als Versuchstiere dienten Kaulquappen von *Rana temporaria* s. *fusca*. Die Kaulquappen wurden jeweils aus einem Laichballen selbst gezogen. Um eine möglichst gleichmäßige Entwicklung der Eier zu gewährleisten, wurden die Laichballen in mehrere kleine Teile zerlegt. Nach dem Ausschlüpfen wurden immer gleich große und im gleichen Entwicklungsstadium stehende Tiere ausgewählt. Dadurch war eine große Gleichmäßigkeit des Tiermaterials gewährleistet.

Als Futter diente Kalbsherzmuskel, der fein zerkleinert, unter milden Bedingungen getrocknet und anschließend pulverisiert wurde. Die Fütterung erfolgte zweimal täglich ad libitum. Die Menge wurde etwa so bemessen, daß ein bis zwei Stunden nach der Fütterung alles Futter aufgenommen war.

Je 10 Larven wurden auf 1 Liter fassende Gläser verteilt, die mit 500 ml Wasser beschickt waren. In die einzelnen Gläser kamen Zweige von sauerstoffspendenden Wasserpflanzen wie *Elodea* (Wasserpest), *Myriophyllum* (Tausendblatt) und *fontinalis* (Gallenmoos), die stehenden Gewässern entnommen worden waren. Die Tiere wurden so reichlich gefüttert, daß das Fressen von Wasserpflanzen in keinem Falle beobachtet wurde. Das Wasser wurde täglich gewechselt und entsprechend temperiertes nachgegeben. Jeden zweiten Tag wurden alle Gläser einer gründlichen mechanischen Reinigung unterzogen. Für jede Versuchsgruppe standen eigene Geräte zur Verfügung, die getrennt aufbewahrt wurden. Weiterhin wurde darauf geachtet, daß die Wassertemperatur während der einzelnen Versuche keinen großen Schwankungen unterworfen war ($20 - 22^{\circ}\text{C}$).

Die Körperlänge der Tiere wurde mit Stechzirkel und Schublehre gemessen. Die Messung erfolgte nach dem Füttern, jedoch vor dem Wasserwechsel, da die Kaulquappen zu diesem Zeitpunkt besonders ruhig waren. Die Längenangaben sind errechnete Mittelwerte, wobei einzelne extrem große bzw. extrem kleine Tiere, die bei Kaulquappen stets vorkommen, nicht berücksichtigt wurden. Im allgemeinen waren die einzelnen Gruppen untereinander sehr ausgeglichen.

Die Beobachtungen über den jeweiligen Stand der Metamorphose wurden sorgfältig aufgezeichnet. Als Metamorphose wurde der Zeitpunkt des Durchbrechens des ersten Vorderbeines gewertet.

Erster Versuch

Der erste Versuch wurde solange weiter geführt, bis die Metamorphose abgeschlossen war und die fertigen Fröschen infolge Luftmangels starben.*

Die Gesamtlänge der Kaulquappen betrug bei Versuchsbeginn 2,48 cm. Die Tiere waren eiförmig, gleichmäßig schwarz gefärbt und die Anlagen der Hinterextremitäten waren gut als pigmentlose Knospen erkennbar.

Die einzelnen wachstumsfördernden Substanzen wurden in dem Wasser gelöst, in dem die Tiere gehalten werden sollten. Nur das Foragynol wurde mit dem Futter verabreicht, da es als kristalline Suspension vorlag und in wässriger Phase schwer homogen zu verteilen war.

Dieser erste Versuch diente zur Übersicht, um die Verträglichkeit der einzelnen Substanzen zu erkennen und um zu prüfen, welche Dosis bei der gewählten Thyroxinkonzentration etwa eine optimale Wirksamkeit versprach. Bei diesem Versuch wurde nur die Körperlänge gemessen und die Metamorphose beobachtet.

Im einzelnen wurden die folgenden Substanzen geprüft:

1. Aureomycin, 2 μ l/ml Wasser
2. Terramycin, 2 μ l "
3. Penicillin, 2 μ l "
4. Vitamin K (als "Synkavit"), 2 μ l/ml Wasser
5. Co-Komplex 100 (Hoechst), 2 μ l/ml Wasser
6. Vitamin D₃, 1000 E in 500 ml Wasser-Hostapal (Hostapal 0,0016 %ig)
7. Vitamin T (Goetsch), 0,1 ml in 500 ml Wasser
8. α - Tocopherol, 1 mg in 500 ml Wasser-Hostapal (Hostapal 0,0016 %ig)
9. Foragynol, 100 μ l/Tier / Tag
10. Kontrolle (a), 0,02 μ d, 1-Thyroxin / ml Wasser
11. Kontrolle (b), reines Wasser
12. Hostapal (c), 0,0016 %ig.

Die Ergebnisse dieses Versuches sind in der Tabelle 1 zusammengestellt. Hinsichtlich der Antibiotika ist zu erwähnen, daß diese Stoffe - in Wasser gelöst - schnell an antibiotischer Wirksamkeit verlieren. Der an-

*) Durch das sehr große Thyroxinangebot trat die Metamorphose so überstürzt ein, daß die entstehenden sehr kleinen Frösche nicht lebensfähig waren.

tithyreoidale Effekt ist daher in diesem Versuch verhältnismäßig gering. Die mit den Antibiotika behandelten Tiere ließen am 7. Tage nach Versuchsbeginn die ersten Metamorphoseerscheinungen erkennen, während bei der Kontrolle mit Thyroxin schon am 6. Tage die Vorderbeine durchzubrechen begannen. Nach 13 Tagen waren die Frösche tot; bei der Kontrolle nach 12 Tagen.

Mit Vitamin K ließ sich bei dieser Versuchsanstellung eine Metamorphoseverzögerung um zwei Tage erzielen.

Bei den Tieren, die den Co-Komplex bekommen hatten, war die Metamorphose gering verzögert. Besonders auffallend war bei dieser Gruppe, daß die Kaulquappen vor der Metamorphose kaum eine Schwanzreduktion erlitten und daß die fertigen Frösche im Verhältnis zu den anderen Gruppen sehr groß waren.

Vitamin D₃, das hier in wäßriger Hostapallösung angeboten wurde, bewirkte deutlichen Mehrzuwachs, gemessen an Hand der Körperlänge. Die Metamorphose war um 4 Tage verzögert. Die Frösche hatten ein normales Aussehen und waren wesentlich größer als die der nur mit Thyroxin behandelten Kontrolltiere. Der Tod trat erst 5 Tage nach dem der Kontrollen ein.

Die Vitamin T-Zulage brachte eine besonders starke Vermehrung der Körperlänge, bei gleichzeitiger erheblicher Metamorphoseverzögerung. Besonders auffällig war, daß der Schwanzsaum auch während der Vorbereitungszeit zur Metamorphose sehr breit blieb.

Das Vitamin E wurde wie das D-Vitamin mit Hilfe von Hostapal in Lösung gebracht. Es bewirkte ebenfalls starkes Mehrwachstum und verzögerte die Metamorphose um zwei Tage. Die fertigen Frösche waren sehr groß. Allerdings ist bei der Beurteilung der durch Vitamin E bzw. D erhaltenen Effekte zu berücksichtigen, daß das Hostapal für sich auch deutlich antithyreoidal wirksam war. Die Kombination von Hostapal und Vitamin E zeigte z.B. die gleiche Aktivität wie Hostapal alleine. Im folgenden Versuch sind diese Faktoren getrennt getestet worden (s.u.).

Foragynol wurde dem Futter beigemischt, weil es in kristalliner Aufschwemmung vorlag. Dadurch wird die stärkere Wirkung im Vergleich zu den anderen Substanzen verständlich. Das Östrogen verursachte einerseits die größte Vermehrung der Körperlänge und schob andererseits das Eintreten der Metamorphose am weitesten hinaus. Die Frösche waren sehr gut entwickelt und sehr groß.

Der positive Effekt des Hostapals, der trotz der sehr großen Verdünnung eindeutig war, wurde schon erwähnt. Bei den Thyroxinkontrollen ließ sich zu-

nächst ein geringer Wachstumsantrieb beobachten, der jedoch schnell durch die einsetzende Metamorphose gestoppt wurde. Die Metamorphose überstürzte sich derart, daß der Schwanz nicht mehr ganz eingeschmolzen werden konnte. Die Fröschechen besaßen wohl sämtliche vier Extremitäten, doch waren diese unproportioniert ausgebildet. Sie waren sehr klein, konnten nicht schwimmen und waren nicht lebensfähig.

T a b e l l e I

Aufzeichnungen über Körperlänge und Metamorphose aus dem 1. Versuch
(Beginn: 10.5.55)

	14.5.	16.	17.	18.	20.	21.	22.	23.	24.	25.	26.5.
Aureomycin	2,60	<u>2,68</u>	B	2,24	2,15	1,72 A	1,60	+			
Terramycin	2,60	<u>2,66</u>	B	2,27	2,03	1,88 A	1,53	+			
Penicillin	2,58	<u>2,61</u>	B	2,58	2,43	2,00 A	1,78	+			
Vitamin K	2,50	2,53		<u>2,67</u> B	2,11	2,06 A	1,88	+			
Co-Komplex	2,60	<u>2,66</u>	B	2,63	2,17 A	2,03	2,00	+			
Vitamin D ₃	2,59	2,62		<u>2,83</u> B	2,45 B	2,30 A	1,93	1,73		+	
Vitamin T	2,62	2,71		<u>2,88</u> B	2,60 B	2,45 A	2,00	1,85			+
Vitamin E	2,60	<u>2,68</u>		2,64 B	2,60	2,38 A	2,28	2,20			+
Foragynol	2,61	2,70		<u>2,92</u>	2,75	2,63	2,48 B	2,22		A	+
Hostapal	2,63	<u>2,78</u>		2,75 B	2,73	2,10 A	1,85	1,65			+
Kontrolle + Thyroxin	<u>2,60</u>	2,55 B		2,48	1,83 A(19.5.)	1,63	1,39 +				
Kontrolle	2,80	2,94		3,30	3,70	3,95	3,99	4,05			

B = Beginn der Metamorphose

A = Abschluß der Metamorphose

+

unterstrichen = größte Gesamtlänge der Tiere

Zweiter Versuch

In dem jetzt zu besprechenden zweiten Versuch wurden die einzelnen Substanzen den Kaulquappen mit dem Futter verabreicht. Nur das Hostapal wurde wiederum wie beim ersten Versuch im Wasser aufgelöst, ebenfalls das Thyroxin.

Haltung, Fütterung und Wasserwechsel waren entsprechend wie beim Versuch 1. Die Kaulquappen stammten ebenfalls aus einem Laichballen, waren gleich groß und sehr ausgeglichen. Sie waren eiförmig, gleichmäßig pigmentiert und sehr lebhaft. Die Hinterextremitäten waren als 1 mm große Extremitätenknospen sehr gut zu erkennen.

Die Körperlänge betrug bei Versuchsbeginn 2,61 cm.

Die zu testenden Substanzen wurden jeden Tag frisch eingewogen, mit dem Futter gut durchgeknetet und so zweimal täglich den Kaulquappen angeboten.

10 Kaulquappen bildeten wieder eine Versuchsgruppe und kamen in 1 Liter fassende Gläser mit 500 ml Wasser. Am 10. Tag wurden sämtliche Tiere mit Chloroform getötet. Zu diesem Zeitpunkt waren bei allen Tieren, die nur Thyroxin erhalten hatten, die Vorderextremitäten durchgebrochen. Nach der Tötung wurde das Frisch- und Trockengewicht bestimmt (Trocknung im Trockenschrank bis zur Gewichtskonstanz).

Die folgenden Gruppen wurden gebildet:

- | | |
|--|--|
| 11. Aureomycin
(100 μ / Tier / Tag) | 52. Vitamin K (d.o.)
(200 μ / Tier / Tag) |
| 12. Aureomycin
(200 μ / Tier / Tag) | 61. 1d- Tocopherol
(100 μ / Tier / Tag) |
| 21. Terramycin
(100 μ / Tier / Tag) | 62. 1d- Tocopherol
(200 μ / Tier / Tag) |
| 22. Terramycin
(200 μ / Tier / Tag) | 71. Vitamin D ₃
(100 E / Tier / Tag) |
| 31. Procain-Penicillin
(100 μ / Tier / Tag) | 72. Vitamin D ₃
(200 E / Tier / Tag) |
| 32. Procain-Penicillin
(200 μ / Tier / Tag) | 81. Foragynol
(50 μ / Tier / Tag) |
| 41. Co-Komplex 100 (Hoechst)
(100 μ / Tier / Tag) | 82. Foragynol
(100 μ / Tier / Tag) |
| 42. Co-Komplex 100 (d.o.)
(200 μ / Tier / Tag) | 91. Vitamin T (Goetsch)
(0,01 ml / Tier / Tag) |

51. Vitamin K ("Synkavit")
(100 μ / Tier / Tag)

92. Vitamin T (Goetsch)
(0,02 ml / Tier / Tag)

01. Hostapal (Hoechst) 0,0008 μ g

02. " " 0,0016 μ g

K₁. Thyroxin 0,02 μ / ml Wasser

K₂. Kontrolle ohne Thyroxin

Die Ergebnisse dieses Versuches sind in der Tabelle 2 zusammengefaßt.

Im allgemeinen ließ die unterschiedliche Dosierung keine Unterschiede in der Wirkung erkennen. Durch die große Thyroxinmenge wurde die Metamorphose sehr schnell eingeleitet und rasch zu Ende geführt. Eine Verzögerung der Metamorphose um wenige Tage ist daher, ebenso wie ein größeres Gesamtgewicht gegenüber den Thyroxin-Kontrollen, besonders beachtenswert.

Die Antibiotika bewirkten bei den Kaulquappen einen deutlichen Längenzuwachs, verglichen stets mit den Larven, die nur mit Thyroxin behandelt wurden. Die Metamorphose trat um zwei Tage später ein. Auch die Frisch- und Trockengewichte waren signifikant höher. Die Aureomycingruppe erreichte die höchsten Werte.

Der Co-Komplex konnte in diesem Versuch die thyroxinbedingte Gewichtsabnahme nicht hemmen. Die Trockengewichte entsprachen denen der Kontrolltiere. Die Metamorphose wurde jedoch deutlich verzögert.

Das Vitamin K zeigte in diesem Versuch nur geringe Wirksamkeit. Die Körperlängen waren in dieser Gruppe etwas größer und die Metamorphose um 24 Stunden verzögert.

Bei den Vitamin-E-Tieren stieg die Körperlänge zuerst nur langsam an; schließlich wurde aber eine sehr große Gesamtlänge erreicht. Diese war zu Beginn der Metamorphose, die zwei Tage nach den Thyroxintieren eintrat, noch sehr erheblich. Das Feuchtwicht war ebenfalls sehr hoch und das Trockengewicht erreichte die höchsten Werte der ganzen Versuchsreihe. Interessanterweise wurden bei den Vitamin E-Tieren besonders große Hinterextremitäten beobachtet.

Die Zufütterung von Vitamin D hemmte ebenfalls den thyroxinbedingten Gewichtsverlust. Diese Tiere waren kurz vor der Metamorphose deutlich länger

als die Kontrolltiere. Für die Länge war allerdings das Frisch- und Trockengewicht verhältnismäßig niedrig, lag jedoch gesichert über dem der Thyroxintiere. Auch bei dieser Gruppe ist die Metamorphose verzögert.

Das Foragynol bewirkte den größten Längenzuwachs. Das Frischgewicht war ebenfalls sehr hoch, während das Trockengewicht stark abfiel. Diese Beobachtung läßt sich dadurch erklären, daß die Kaulquappen zu Versuchsende noch keinerlei Anzeichen zur Metamorphosevorbereitung zeigten; die entwässernde Wirkung des Thyroxins, die zu diesem Zeitpunkt in Erscheinung tritt, hatte noch nicht eingesetzt.

Die synthesefördernde Wirkung des Vitamins T war besonders deutlich ausgeprägt. Kurz vor dem Beginn der Metamorphose ging die Körperlänge jedoch stark zurück. Das Feucht- und Trockengewicht war gegenüber den Kontrollen erhöht, und die Metamorphose hinausgezögert.

Das Hostapal wurde nicht gefüttert, sondern im Wasser gelöst angeboten. Die Tiere wuchsen in diesem Milieu anfangs sehr langsam, erreichten später aber eine große Länge, die am Tage der Tötung am größten war. Die Frisch- und Trockengewichte lagen weit über denjenigen der Thyroxin-Kontrollen. Am Tage der Tötung hatte die Metamorphose noch nicht begonnen.

Das Thyroxin, allein dem Wasser zugesetzt, regte die Kaulquappen primär deutlich zum Wachstum an. Eine größere Körperlänge wurde allerdings in keinem Falle erreicht, da die Metamorphose sehr bald in Erscheinung trat. Am 8. Versuchstag begannen die Vorderextremitäten durchzubrechen und am 10. Tag war die Metamorphose vollständig abgeschlossen.

Die Kontrolltiere in reinem Wasser wuchsen in natürlicher Weise. Bei der Tötung ergab sich ein im Verhältnis zur Größe und zum hohen Feuchtgewicht äußerst geringes Trockengewicht. Es wurde schon angedeutet, daß bei der Foragynol-Gruppe eine ähnliche Beobachtung gemacht wurde.

T a b e l l e II

Aufzeichnungen über Körperlänge und Metamorphose

Versuchs- gruppe	6.6.	8.6.	9.6.	10.6. ⁺⁺	mg Frisch- gewicht	mg Trocken- gewicht	P %
11	2,93	<u>3,03</u>		2,90	155,4+6,2	17,0+0,55	0,1
12	3,04	<u>3,07</u>		2,89 B	150,2+5,3	16,7+0,61	0,1
21	3,06	<u>3,10</u>		2,90	153,3+6,3	13,8+0,69	3,5
22	3,01	<u>3,40</u>		2,87 B	140,8+3,3	14,1+0,45	2,6
31	3,00	<u>3,04</u>		2,80	137,4+4,7	14,3+0,52	1,1
32	2,94	<u>2,96</u>		2,75 B	148,3+5,4	15,2+0,44	0,1
41	2,89	<u>2,90</u>		2,71	116,7+6,4	11,0+0,64	
42	2,91	<u>2,95</u>		2,85 B	127,3+4,6	12,1+0,58	
51	2,99	<u>3,02</u>		2,70	130,3+4,7	12,0+0,41	
52	2,88	<u>3,07</u>		2,55	127,7+5,9	12,0+0,61	
			B				
61	3,35	3,37	<u>3,38</u>	3,33	190,8+13,0	19,8+1,4	0,1
62	3,24	3,24	<u>3,31</u>	3,24	149,7+6,1	16,0+0,74	0,1
				B			
71	3,21	<u>3,24</u>		3,14	138,7+5,8	14,4+0,8	1,1
72	3,26	<u>3,26</u>		3,18 B	143,6+3,3	14,9+0,63	0,4
81	3,25	3,28		<u>3,46</u>	205,5+7,1	16,1+0,72	0,1
82	3,26	3,26		<u>3,37</u> +	195,7+7,8	15,0+0,75	1,4
91	3,25	<u>3,25</u>		2,75	161,5+7,6	14,8+0,76	1,4
92	3,26	<u>3,26</u>		2,80	144,4+3,2	15,6+0,23	0,1
				B			
01	3,15	3,20		<u>3,22</u>	144,0+3,7	16,7+0,68	0,1
02	3,24	3,23		<u>3,24</u> +	166,4+6,8	17,7+0,62	0,1
K nur							
Thyroxin	<u>2,89</u>	2,77		2,30	127,0+5,6	11,9+0,69	
		B					
K reines Wasser	3,37	3,64		3,79	322,3+16,2	22,4+1,6	

B = Beginn der Metamorphose

+ = Anzeichen des Beginns der Metamorphose sind

unterstrichen = nicht vorhanden
größte Länge der Kaulquappen ++ = Datum

D r i t t e r V e r s u c h

Abschließend wurde noch ein dritter Versuch angesetzt, bei dem Kupfersulfat - gemeinsam mit Thyroxin im Wasser gelöst - den Kaulquappen angeboten wurde. In einem orientierenden Vorversuch war ermittelt worden, daß 2 bzw. 4 μ g Kupfersulfat / ml Wasser zu hoch bemessen und für die Kaulquappen toxisch waren. Die Dosis wurde daher auf 1 bzw. 0,5 μ g / ml reduziert. Außerdem wurde der Co-Komplex noch einmal geprüft, der im Versuch 2 trotz erheblicher Verzögerung der Metamorphose keinen Einfluß auf das Körpergewicht der Kaulquappen hatte erkennen lassen. Der Co-Komplex wurde wiederum mit dem Futter verabreicht (100 bzw. 200 μ g / Tier / Tag).

Auch für diesen Versuch waren alle Kaulquappen aus einem Laichballen gezüchtet worden. Das Material war hinsichtlich der Körpergröße sehr ausgeglichen und im gleichen Entwicklungszustand. Die Größe der Tiere betrug bei Versuchsbeginn 3,20 cm.

Die Versuchsbedingungen entsprachen den vorher beschriebenen. Allerdings mußten zwei Kontrollgruppen gebildet werden, die ausschließlich 0,02 μ g Thyroxin / ml Wasser erhielten, da die Gruppe, die den Co-Komplex erhielt, zwei Tage später angesetzt worden war und daher eine gesonderte Kontrolle benötigte.

Die E r g e b n i s s e zeigt die Tabelle 3. Die Feucht- und Trockengewichte der Tiere, die zusätzlich Kupfersulfat erhielten, waren im Vergleich zu den Thyroxintieren erhöht. Die Metamorphose trat um 3 Tage verzögert ein. Als besonders auffällig ist zu vermerken, daß die Gruppe mit Kupfersulfat den ganzen Versuch über charakteristisch blaß und farblos war, während sich die Kontrolltiere (nur Thyroxin) tiefschwarz zeigten.

Der Co-Komplex bewirkte dieselbe Metamorphoseverzögerung um zwei Tage, die schon im Versuch 2 erhalten worden war. Zusätzlich waren jetzt aber die Feucht- und Trockengewichte deutlich erhöht, so daß man wohl annehmen darf, daß der Co-Komplex ähnlich antithyreoidal aktiv ist wie die im zweiten Versuch getesteten Antibiotika.

T a b e l l e I I I

Aufzeichnungen über Körperlänge und Metamorphose aus dem Versuch 3
(Beginn: 10. 7. 55)

Gruppe	15.7.	17.7.	19.7.	20.7.	22.7. ⁺	mg Frisch- gewicht	mg Trocken- gewicht	P %
Kupfersul- fat, 4 g/ml	3,33	3,42		<u>3,48</u>	3,44 B	163,1 ₊ 7,8	15,0 ₊ 0,8	2,8
Kupfersul- fat, 2 g/ml	3,15	3,20		<u>3,22</u>	3,10 B	140,3 ₊ 6,6	14,9 ₊ 0,9	
Kontrolle	<u>3,26</u>	3,13	B	2,98	2,92	126,3 ₊ 5,4	13,1 ₊ 0,8	

	17.7.	19.7.	21.7.	23.7. ⁺				
Co-Komplex 100 g/T./T.	3,30	<u>3,32</u>	B	2,61	149,4 ₊ 5,0	13,6 ₊ 0,6	< 1 %	
Co-Komplex 200 g/T./T.	3,16	<u>3,28</u>	B	2,69	136,0 ₊ 6,5	12,7 ₊ 0,8		
Kontrolle	<u>3,20</u>	3,19 B		2,00	124,9 ₊ 9,2	10,9 ₊ 0,2		

⁺ = Datum

B = Beginn der Metamorphose

unterstrichen = größte Körperlänge der Tiere

D i s k u s s i o n

Die beschriebenen Versuche scheinen dafür zu sprechen, daß alle geprüften Verbindungen, getestet an der sehr empfindlichen Kaulquappe, antithyreoidale Aktivität besitzen. So heterogen der chemische Charakter der untersuchten Substanzen ist, so gleichmäßig scheint von allen die Thyroxinwirkung gehemmt zu werden, auch wenn man auf molare Verhältnisse umrechnet. Die Molekulargewichte schwanken etwa zwischen 200 und 500. Entsprechend erwiesen sich bei allen Verbindungen 50 - 100 μ g Tier / Tag als optimal wirksam.

Da das Thyroxin in großem Überschuß eingesetzt wurde, die endogene Thyroxinproduktion der Kaulquappen also vernachlässigt werden kann, läßt sich aus diesen Ergebnissen weiterhin ableiten, daß die antithyreoidale Wirkung aller Substanzen im intermediären Stoffwechsel zu suchen ist. Der Effekt ist also biochemisch mit der Thiouracilwirkung nicht vergleichbar, sehr wohl dagegen physiologisch, da in beiden Fällen die Thyroxinwirkung eingeschränkt wird. Die Frage nach der Wirkungsweise dieser Verbindungen scheint daher mit der Frage nach der Entstehung der hier beobachteten antithyreoidalen Effekte in engstem Zusammenhang zu stehen.

Es wurde schon darauf hingewiesen, daß die chemische Grundreaktion, die zu einer Umschaltung des Zellstoffwechsels von vermehrt abbauenden zu vermehrt aufbauenden Prozessen Anlaß gibt (Änderung der Resultantenstellung, vgl. S.), anscheinend keiner besonderen Spezifität bedarf, da diese Reaktion von sehr vielen, chemisch vollkommen verschiedenen Verbindungen übernommen werden kann. Auch mehrwertige Alkohole (54) (1,3-Butandiol, Meso-Erythrit) sind z.B. im Tierversuch als "wachstumswirksam" befunden worden. Auch in diesem Falle betrug die Mehrzunahme 10-20 %. Dieselben Verbindungen haben sich in der Humanmedizin zur Normalisierung hyperthyreotischer Stoffwechselzustände als geeignet erwiesen (55). Sogar elementares Brom beschleunigte die Gewichtszunahme von Küken um 8 - 10 % (56), während KBr (0,5 mg / kg Körpergewicht) nach russischen Mitteilungen die Thyroxinwirkung auf den Gasaustausch weitgehend aufzuheben vermag (57).

Es läßt sich weiterhin aussagen, daß die Reaktion keineswegs an die Gegenwart des Thyroxins gebunden ist. Auch bei Pflanzen ließ sich statistisch gesichertes Mehrwachstum durch Beigabe von Östrogenen, Kupfersulfat oder auch Antibiotika erzielen (58; 59; 60). Sogar Mikroorganismen, deren Wachstum durch Antibiotika gehemmt wird, werden durch "optimale" Konzentrationen derselben

Hemmstoffe, wie sie z.B. an den Randgebieten von Antibiotikahemmzonen auftreten (61), zum Wachstum angeregt. Nach diesen Erfahrungen scheint die Möglichkeit, die Stoffwechselresultate durch eine unspezifische Reaktion zu Gunsten der Synthese von Zellsubstanz zu verschieben, auf einem biologischen Grundphänomen zu beruhen.

Es hat primär den Anschein, als sei es am erfolgversprechendsten, bei der näheren Untersuchung der fraglichen Reaktion von den bisherigen Kenntnissen über die Wirkungsweise des Thyroxins auszugehen. Nach Martius (62) reguliert das Thyroxin durch Steuerung der Kopplung von Atmung und oxydativer Phosphorylierung den "Sog" des Substratwasserstoffs zur Atemkette. Das bedeutet, daß der Elektronentransport, der einerseits direkt (Atmung), andererseits auf dem "Umweg" über ein phosphorylierendes System (oxydative Phosphorylierung) dem Sauerstoff zugeführt werden kann, bei steigendem Thyroxinangebot in zunehmendem Maße den direkten Weg der Atmung bevorzugt. Eine antithyreoidale Wirkung wäre demnach theoretisch durch Umleitung des Elektronentransportes auf den Weg der Phosphorylierung denkbar; ein solcher Mechanismus ist aber wegen der chemischen Heterogenität der antithyreoidal aktiven Verbindungen faktisch auszuschließen, da ein derartiger Prozeß eine ganz spezifische Reaktion erfordern würde.

Eine andere Beobachtung scheint dagegen weiterhelfen zu können. Für die meisten der hier untersuchten Substanzen konnte nachgewiesen werden, daß sie ebenfalls die Wirkungsentfaltung der Nebennierenrinden (NNR)-Hormone antagonisieren (63). Es läßt sich also der interessante Befund registrieren, daß zahlreiche Stoffe, die chemisch untereinander sehr verschieden sind, sich gleichzeitig gegenüber zwei Hormonen bzw. Hormongruppen antagonistisch verhalten. Dieses Ergebnis läßt die Vermutung aufkommen, daß zwischen der Wirkungsweise beider Hormone ein physiologischer Zusammenhang besteht. Tatsächlich geht aus Versuchen von Doetsch u. M. und Cori u. M. (64; 65), die durch Schole und Funk (66) bestätigt und erweitert werden konnten, hervor, daß die Stoffwechselwirkung des Thyroxins ausbleibt, wenn bei den Versuchstieren vor der Thyroxingabe die Nebennieren entfernt werden. Wird gleichzeitig Cortison oder DOC gegeben, tritt der Thyroxineffekt wie bei normalen Tieren auf.

Da nach diesen Ergebnissen die NNR-Hormone anscheinend die Voraussetzung schaffen für die Wirkungsentfaltung des Schilddrüsenhormons, dürfte der Antagonismus zwischen der wachstumswirksamen Substanz und den NNR-Hormonen von primärer Bedeutung sein und den antithyreoidalen Effekt zwangsläufig nach sich ziehen. Damit besteht aber die Möglichkeit, daß der primäre Antagonismus biochemisch ein direkter ist, d.h. daß das NNR-Hormon genau die entgegenge-

setzte Reaktion katalysiert wie die anabol wirkende Substanz. Aus diesem Grunde ist zu prüfen, ob die Kenntnis der Wirkungsweise der NNR-Hormone Anhaltspunkte über die Reaktion zu liefern vermag, die zum Auftreten anti-thyreoidaler Effekte im intermediären Stoffwechsel führt.

Allgemein läßt sich aussagen, daß nach jeder beliebigen "Belastung" eine vermehrte Ausschüttung von NNR-Hormonen zu beobachten ist. Diese Reaktion ist also scheinbar vollkommen unspezifisch. Die nähere Analyse dieses Vorgangs führt allerdings zu der Erkenntnis, daß nur dann eine positive Reaktion erfolgt, wenn zur Normalisierung der Belastung eine Intensivierung des Energiestoffwechsels erforderlich ist. Man muß beispielsweise die dauernde Erhöhung der Raumtemperatur auf $30-35^{\circ}\text{C}$ ebenso als "Belastung" für einen Organismus werten wie die entsprechende Senkung auf $5-10^{\circ}\text{C}$. Eine Stimulierung der NNR-Funktion tritt aber nur im letzteren Falle auf, wie sich aus Fütterungsversuchen an Ratten ableiten läßt (67).

Andererseits scheint generell durch Oxydationsmittel, deren Normalpotential positiver ist als etwa $-0,2$ Volt, eine NNR-Reaktion erzielt werden zu können. Nach Zuführung von Reduktionsmitteln, z.B. Ascorbinsäure, ist dagegen genau der umgekehrte Effekt, nämlich eine Einschränkung der NNR-Aktivität zu beobachten ("Negativer Stress"). Auch durch diese Befunde wird der Eindruck erweckt, als sei die Reaktion unspezifisch. Allein durch die Tatsache, daß sehr viele Fermente Wirkgruppen enthalten, die einerseits für die Fermentaktivität unentbehrlich, andererseits aber außerordentlich oxydationsempfindlich sind - nämlich Sulphydrilgruppen -, scheint diese Reaktion besonders spezifisch zu sein.

Aus dieser Sicht heraus scheinen die Hormone der NNR Ferment-SH-Gruppen vor der Oxydation zu schützen und damit den Energiestoffwechsel aufrecht zu erhalten. Eine derartige Hypothese wurde erstmalig von Laszt (68) entwickelt. Nach Untersuchungen dieses Autors beeinflußt Cystein den Gesamtstoffwechsel von Ratten ähnlich wie die Corticosteroide, während Thiolgifte wie Cystin, Selenit oder auch Alloxan gerade die entgegengesetzten Effekte auslösen. Vom gleichen Verfasser wurde schon 1936 berichtet, daß jodessigsäurevergiftete Ratten ähnliche Ausfallerscheinungen zeigen wie nebennierenlose Tiere (69). Nach neueren Untersuchungen läßt sich diese Vergiftung durch DOC normalisieren (70). Von anderer Seite wurde berichtet, daß die nach Röntgenbestrahlung eintretende NNR-Reaktion durch Cysteingaben verhindert werden kann (71). Die bei der Bestrahlung auftretenden OH-Radikale (72) scheinen sich mit Hilfe von Sulhydrilelektronen absättigen zu können, was zur Inaktivierung von SH-Fermenten führt. Die endogene Bereitstellung von NNR-Hormonen gibt nach diesen Er-

gebissen ebenso einen Strahlenschutz, wie die exogene Zufuhr einer SH-Verbindung, was mit den oben beschriebenen Versuchen von Laszt übereinstimmt.

Auf der anderen Seite scheinen die wachstumswirksamen Verbindungen als Oxydationsmittel und damit als Antagonisten der NNR-Hormone zu fungieren. Das Cu^{++} -Ion ist bei Gegenwart von Sauerstoff zur katalytischen Oxydation von SH-Gruppen befähigt. Durch Untersuchungen in diesem Institut (73) konnte außerdem der Beweis erbracht werden, daß die Tetracycline und das Penicillin ähnlich katalytisch wirksam sind wie das Cu^{++} -Ion. Träger des Red-Ox-Systems scheinen bei den Tetracyclinen enolische Hydroxylgruppen, beim Penicillin

die $\begin{array}{c} \text{H} & \text{H} & \text{H} \\ | & | & | \\ -\text{N} & - \text{C} & - \text{C} - \\ | & | & | \\ \text{O} & = \text{C} & - \text{N} - \end{array}$ -Gruppierung zu sein. Außerdem führten orientierende Ver-

suche an Bäckerhefe zu dem Ergebnis, daß die fettlöslichen Vitamine und Östrogene den SH-Glutathiongehalt der Hefe in ähnlicher Weise vermindern wie die genannten Antibiotika. Da diese fettlöslichen Verbindungen ebenfalls aktivierte Hydroxylgruppen im Molekül enthalten, könnte man einen entsprechenden Mechanismus der katalytischen SH-Gruppenoxydation diskutieren wie bei den Tetracyclinen (74).

Von entscheidender Wichtigkeit ist die Tatsache, daß alle Verbindungen ohne die Anwesenheit eines Oxydationsmittels keine Red-Oxsysteme liefern können. Zur Demonstration der Cu- bzw. Antibiotikumkatalyse ist schon molekularer Sauerstoff geeignet (73). Dieser Befund scheint für das Prinzip biologischer Regulationen von fundamentaler Bedeutung zu sein. Da die Fermente der biologischen Oxydation, die in vivo als Oxydationsmittel in Frage kommen, ausschließlich in den Mitochondrien und Mikrosomen lokalisiert sind, werden nämlich die plasmatischen Fermente und Fermentsysteme dem Einfluß derartiger Regulatoren entzogen.

Wenn man die hier in aller Kürze aufgezählten Gedankenverbindungen zusammenfaßt, so erhält man folgendes allgemeine Bild von der biologischen Stoffwechselregulation:

Die wichtigsten Fermente des Energiestoffwechsels, die Fermente des Fettsäure- und Zitronensäurecyklus und der Atemkette sind in den Mitochondrien konzentriert. Da sie als SH-Fermente in nächster Nähe der Oxydationsenzyme angeordnet und daher gegen katalytische Oxydationsmittel besonders empfindlich sind, bedürfen sie des wirksamen Schutzes der NNR-Hormone, welche die SH-Form aufrechterhalten.

Die im Zitronensäurecyklus hydrierten Co-Dehydrogenasen werden in der Atemkette oxydiert, und zwar bei steigendem Thyroxinangebot mit entsprechend steigender Geschwindigkeit. Der durch die schnellere Oxydation entstehende "Sog" führt automatisch zu einer Beschleunigung der Umlaufzahl des Zitronensäurecyklus und damit zu einer Intensivierung des Energiestoffwechsels. Tritt jetzt ein Oxydationsmittel in die Mitochondrien ein und hemmt durch unspezifische SH-Gruppen-Oxydation beispielsweise nur ein Ferment, so wird dieses Ferment für die Umlaufzahl des Kreisprozesses begrenzend sein und nicht mehr die Anwesenheit des Thyroxins in der Atemkette. Durch diese Überlegung läßt sich einleuchtend erklären, warum die Zuführung eines unspezifischen Oxydationsmittels zum gleichzeitigen Auftreten eines antithyreoidalen und eines "anticorticoiden" (der NNR-Funktion entgegenlaufenden) Effektes führt. Alle in dieser Arbeit untersuchten Verbindungen können nach den vorangegangenen Erörterungen als unspezifische Oxydationsmittel aufgefaßt werden. Die Chemie der Hostapal- bzw. T-Vitamin-Wirkung ist allerdings noch unklar.

Führt man diese Überlegungen nur wenig weiter, so wird auch die so seltsam erscheinende Tatsache biochemisch verständlich, daß die Anwesenheit eines unspezifischen Oxydationsmittels in der Zelle eine Verstärkung des zellulären Synthesestoffwechsels nach sich zieht. Ein kurzes Gedankenexperiment mag diese Behauptung erläutern:

Beim Eintritt von Nahrungsbausteinen in eine Zelle tritt sofort eine intrazelluläre Konkurrenz zwischen Plasma- und Mitochondrienfermenten auf, und zwar dürfte die Menge an Fettsäuren und Aminosäuren, die in die Mitochondrien wandert und dort oxydiert wird, dem von der Atemkette her ausgeübten "Sog" und damit der NNR-Hormon- + Thyroxinwirkung direkt proportional sein. Die Fermente des Plasmas bzw. des Zellkernes, die für die Synthese von Glykogen und Eiweiß- und Fettsubstanzen verantwortlich sind, scheinen dagegen nur ein zwischen Eiweiß und Aminosäuren bzw. zwischen Acetyl-CoA und Fettsäuren bestehendes Gleichgewicht einzustellen, das mit steigendem Bausteinangebot zu Gunsten der Synthese ("Synthesedruck") und bei schneller Oxydation der Bausteine zu Gunsten der Spaltung ("Oxydations-Sog") verschoben wird. Es handelt sich hier also um Fließgleichgewichte, die kontinuierlich entweder durch Abtransport des Syntheseproduktes (Ermöglichung weiterer Synthese) oder durch Oxydation der niedermolekularen Spaltprodukte (fortlaufen-

*) Nach neueren Arbeiten wird auch in den Mikrosomen Eiweiß synthetisiert (75).

der Abbau) verschoben werden können.

Für die Fettsynthese ist die Richtigkeit dieser Vorstellung praktisch bewiesen worden. Nach Brady u. M. findet die Synthese von Fettsäuren aus C^{14} -Acetat ausschließlich im Plasma statt, der Fettsäureabbau dagegen ausschließlich in den Zellpartikeln. Das erforderliche TPN-H entsteht z.T. durch die Anwesenheit einer TPN-spezifischen Isozitroneisensäuredehydrase im Plasma, zum größeren Teil durch direkte Dehydrierung von Glukose-6-phosphat (Pentosephosphatzyklus). Was die Mitochondrien für die Fettsäuresynthese beisteuern ist fast ausschließlich die erforderliche Energie in Form von ATP.

Für die Eiweißsynthese dürfen ähnliche Verhältnisse angenommen werden. Allerdings darf die Überführung von Ammonium-Stickstoff in Aminostickstoff und die Transaminierungsreaktionen nicht unterschlagen werden, Prozesse, die im wesentlichen in den Mitochondrien lokalisiert sind. Da aber die essentiellen Aminosäuren hier nicht entstehen können, kommt eine Hemmung des Aminosäureabbaus einem Spareffekt für essentielle Aminosäuren und damit einer Förderung der Eiweißsynthese gleich. Man kann daher die auf Seite 2 begonnenen Überlegungen dahingehend präzisieren, daß der Optimalzustand der Stoffwechselregulation genau dann erreicht wird, wenn die Mitochondrien gerade die Energiemenge bereitstellen, die für alle zum Wachstum erforderlichen Synthesen und zur Zellteilung benötigt wird. Bei dieser "Resultantenstellung" dürften noch ausreichende Mengen an nicht essentiellen Aminosäuren aus dem Mitochondrienstoffwechsel zur Verfügung gehalten werden können.

Die hier in aller Kürze entwickelte Vorstellung über das Prinzip der biologischen Stoffwechselregulation und die Wirkungsweise wachstumswirksamer Substanzen ist zweifellos in allen Einzelheiten nicht bewiesen, kann aber wohl als einleuchtende Arbeitshypothese für weitere Untersuchungen angesehen werden. Richtig scheint der Grundgedanke zu sein, daß die Regulation über den Energiestoffwechsel erfolgt und daß dieses Prinzip nur dadurch verifiziert werden kann, daß in der Zelle

1. der Energiestoffwechsel räumlich vom Synthesestoffwechsel weitgehend abgetrennt wird und daß
2. die eingesetzten Regulatoren spezifisch nur den Energiestoffwechsel beeinflussen.

Dieses Grundprinzip ist für die Bakterienzelle, die Pflanzenzelle und die

Säugerzelle gültig, und es hat den Anschein, als ob aus diesem Grunde die in dieser Arbeit untersuchten Substanzen bei allen drei Zellarten in gleicher Weise wirksam sind.

Zusammenfassung

Es wurde untersucht, ob die durch Thyroxin beschleunigte Kaulquappenmetamorphose bei gleichzeitiger Zuführung einiger wachstumswirksamer (synthesefördernder, anaboler) Verbindungen gehemmt werden kann. Die folgenden Substanzen wurden geprüft:

Aureomycin, Terramycin, Penicillin, Co-Komplex 100 (Hoechst), Vitamin E, D und K, Foragynol, Vitamin T (Goetsch), Hostapal (Hoechst) und Kupfersulfat.

Wurde nur Thyroxin in einer Konzentration von $0,02 \mu\text{g/ml}$ Wasser angeboten, so begann die Metamorphose am 8. Versuchstag und war am 10. Tag abgeschlossen. Gleichzeitig wurde ein großer Teil der Körpersubstanz eingeschmolzen. Die zusätzliche Gabe einer wachstumswirksamen Substanz verzögerte den Eintritt der Metamorphose um 1 - 3 Tage und verminderte eindeutig den Verlust an Körpersubstanz (Trockengewicht). Die schnelle Abnahme der Körperlänge (Einschmelzen des Schwanzes) wurde ebenfalls deutlich verzögert.

Abschließend wurde versucht, eine Erklärung dafür zu finden, daß chemisch derart verschiedene Substanzen in etwa gleichem Ausmaß die Thyroxinwirkung einschränken. Durch die Annahme, daß alle untersuchten Verbindungen in vivo Red-Ox-Systeme liefern, die - in Wechselwirkung mit Fermenten der Atmungskette - durch unspezifische SH-Gruppen-Oxydation die Aktivität einzelner Enzyme des Zitronensäurezyklus vermindern und damit den thyroxinbedingten "Sog" zur Substratdissimilation herabsetzen, scheint eine vorläufige Erklärung der erhobenen Befunde möglich zu sein.

L i t e r a t u r

1. Jukes, T.H.: "Antibiotics in nutrition", Med. Encyklopedia, I.N.C., New York
2. Schaper, G.: Fleischwirtschaft 3, 14 (1953)
3. "Stoffwechsel der Steroidhormone", Zweites Freiburger Symposium, Springer 1955
4. Money, W.L., J. Fager, V. Lucas, R.W. Rawson: Endocrin. (Spr. III) 51, 87 (1952)
5. Reber, E.F.: J. Nutrition 58, 19 (1956)
6. Juraz, H., R. Schäfer: Erg. inn. Med. 45, 199 (1937)
7. Saputo, V., A. Atti: Congr. ital. Pediat. 356, 1940
8. Canseret, J.: C. r. Acad. Sci. (Paris) 238, 160 (1954)
9. Nesen, R., W. Altenkirch, E. Otto: Arch. f. Tierernähr. 4, 258 (1954)
10. Nesen, R., W. Gastmeyer: Arch. f. Tierernähr. "Festschrift Scheunert", S. 234, 1954
11. Chiesura, E., P. Petrides: Therapie der Gegenw. 91, 450 (1952)
12. Heyn, G.: Vit. Horm. Fermentföschg. 4, 121 (1951/52)
13. Hill, H. u. Mitarb.: B-M-Tierärztl. Wöschr. 2, 31 (1952)
14. Beeson, W.M., T.W. Perry, P.J. Reynolds: A. Anim. Sci. 12, 619 (1953)
15. Lassiter, C.A., T.W. Denton, G.M. Bastin: Publication 66, Univ. Kentucky, Lexington 1953
16. Braude, R. u. Mitarb.: Brit. J. Nutrit. 9, 358 (1955)
17. Bass, B. u. Mitarb.: J. Anim. Sci. 15, 1230 (1956)
18. Barber, R.S. u. Mitarb.: Brit. J. Nutrit. 11, 70 (1957)
19. Seelemann, M., Graf v. Baudissin, F.: Kieler Milchw. Forschungsberichte 5, 559 (1953)
20. Seelemann, M., Graf v. Baudissin, F.: Zbt. f. Veterinärmed. 1, 354 (1954)

21. Russo, J.M., L.E. Hanson, J.J. Jezeski: J. Anim. Sci. 13, 998 (1954)
22. Luckey, T.D., H.A. Gordon, J.A. Reyniers: Antibiot. a. Chemother. 6, 36 (1956)
23. Goetsch, W.: Österr. Zool. Ztschr. 1, 193 (1947)
24. Elam, J.F. u. Mitarb.: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. 78, 832 (1951)
25. Tayler, J.H., W.S. Gordon: Nature (Lond.) 176, 312 (1955)
26. Wacker, A. u. Mitarb.: Arzneim.-Forsch. 5, 702 (1955)
27. Wacker, A. u. Mitarb.: Arzneim.-Forsch. 6, 712 (1956)
28. Dick, E.C., K.R. Johansson: Antibiotics a. Chemother. 7, 349 (1957)
29. Asher, Th., R. Müller: Ztschr. f. Tierzüchtung u. Züchtungsbiologie 59, 265 (1951)
30. Vogel, H., Jhs. Brüggemann, J. Schole: Landw. Jahrb. 29, 61 (1952)
31. Schole, J.: Dissertation München, 1955
32. Meites, J., R.C. Ogle: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. 77, 758 (1951)
33. Ershoff, B.H.: Arch. of Biochem. 28, 359 (1950)
34. Menge, H., M.H. Conner: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. 88, 216 (1955)
35. Bodansky, M., V.B. Duff: Endokrinologie 20, (1936)
36. Desclin, L.: C. r. Soc. Biol. (Paris) 146, 781 (1952)
37. Sadhu, D.P., S. Brody: Amer. J. Physiol. 149, 1947
38. Braunsteiner, H., F. Mlezoch: Wiener Ztschr. inn. Med. 31, 186 (1950)
39. Hesse, E., K.R. Jakobi, G. Bregulla: Arch. f. exper. Path. 170, 13 (1933)
40. Hesse, E., H. Vonderlinn, L. Zeppeneisel: Arch. f. exper. Path. 173, 192 (1933)
41. Romeis, B.: Abderhaldens Handb. d. biol. Arbeitsmeth. V, T. 3A, 501
42. Mustakallio, K.K., A. Telkkä: Ann. med. Exper. Biol. fenn. 32, 9 (1954)
43. Müller, K., R. Mislin: Ztschr. f. Vit. Horm. Fermentfösch. 16, 169 (1945)
44. Telkkä, A., K.K. Mustakallio: Ann. med. Exper. Biol. fenn. 31, 91 (1953)

45. Gessner, W.: Ztschr. f. Biol. 86, 67 (1927)
46. Wurmbach, H.: Verh. d. Deutsch. zool. Ges. 1950
47. Wurmbach, H.: Roux Arch. 145, 693 (1952)
48. Wurmbach, H., H. Hardick: Roux Arch. 146, 68 (1952)
49. Eufinger, H., J. Gottlieb: Klin. Wo. 12, 1397 (1953)
50. Martella, E.: Arch. ostetr. e ginekol. Napoli 54, 522 (1949)
51. Fischer, R.: Ztschr. f. Vitaminschg. 18, 308 (1947)
52. Goetsch, W.: Vit. Horm. Fermentfchg. 1, 87 (1948/49)
53. Goetsch, W.: Naturwiss. 33, 151 (1946)
54. Schlüssel, H.: Klin. Wo. 31, 768 (1953)
55. Gremels, H.: Arch. Exper. Pharm. 205, 57 (1948)
56. Bosshardt, D.K., J.W. Huff: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. 92, 219 (1956)
57. Dzgoeva, T.O., Fiziol. Z. (Kiew) 1, 111 (1955)
Zt. nach Rona 187, 287 (1957)
58. Scharrer, K., W. Schropp: Biochem. Ztschr. 281, 314 (1935)
59. Scharrer, K., W. Schropp: Bodenk. u. Pflanzenernährung 1, 168 (1936)
60. Nickell, L.G., A.C. Finlay: J. Agri a. Food Chem. 2, 178 (1954)
61. Rehm, H.J.: Naturwiss. 43, 183 (1956)
62. Martius, C.: 5. Coll. d. Ges. f. physiol. Chem. Moosbach 1954
63. Schole, J.: Unveröffentlicht
64. Doetsch, R., F. Verzar, H. Wirz: Helv. Physiol. Acta 3, 565 (1945)
65. Hoffmann, F., O. Cori, A.T. de Cori: Acta physiol. lat. amer. 1, 84 (1951)
66. Schole, J., F. Funk: Naturwiss. 44, 183 (1957)
67. Young, D.R., S.F. Cook: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. 89, 482 (1955)
68. Laszt, L.: Erstes Freiburger Symposium, Juni 1952
69. Laszt, L., F. Verzar: Pflügers Archiv 237, 483 (1936)
70. Köhler, V., R. Bauer: Arch. exper. Path. u. Pharm. 214, 447 (1952)

71. Maxwell, C.R., D.C. Peterson, N.E. Sharpless: Radiation Res. 1, 530
(1954)
72. Hornykiewytsch, T.: Strahlenth. 86, 1952
73. Brennenberger, H.: Dissertation München, 1956
74. Schole, J.: Unveröffentlicht
75. Turba, F., P.W. Jungblut: Tagung d. deutsch. Ges. f. physiol. Chem.
Basel 1957

Herrn Professor Dr. Dr. Johannes B r ü g g e -
m a n n sage ich an dieser Stelle meinen Dank
für die freundliche Überlassung des Themas sowie
die großzügige Unterstützung und Förderung der Ar-
beit.

Für viele wertvolle Anleitungen bin ich Herrn
Dr. Jürgen S c h o l e zu besonderem Dank ver-
pflichtet.

Lebenslauf

Am 25. Oktober 1927 wurde ich, Carl Maria Hieber, als zweites von sieben Kindern, des damaligen Notariatsassessors Hans Hieber und seiner Ehefrau Johanna Hieber geboren. Nach vierjährigem Besuch der Volksschule in München trat ich in das Theresiengymnasium in München ein. Dort verblieb ich bis zu meiner Einberufung als Luftwaffenhelfer. Nach meiner Entlassung aus dem Wehrdienst legte ich die Reifeprüfung 1951 an der Oberrealschule in Neu-Ulm ab.

Mein Studium begann ich im Sommersemester 1952 nach 3-monatigem Aufbaudienst an der Tierärztlichen Fakultät der Universität München und beendete es im Wintersemester 1957 mit dem Staatsexamen.



